

PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11)Publication number : 07-316079

(43)Date of publication of application : 05.12.1995

(51)Int.Cl.

A61K 49/00
A61K 9/127
A61K 47/24
A61K 49/04

(21)Application number : 07-068177

(71)Applicant : DAI ICHI SEIYAKU CO LTD
NYCOMED IMAGING AS

(22)Date of filing : 27.03.1995

(72)Inventor : KIKUCHI HIROSHI
YANAI KIYOTO
YOO KURABENESU
ARNE BERG
TORONDO BEE JACOBSEN
PAUL LONGBED
TORFIN EGE

(30)Priority

Priority number : 06 57480 Priority date : 28.03.1994 Priority country : JP

(54) LIPOSOME

(57)Abstract:

PURPOSE: To obtain a diagnostic composition composed of an aqueous medium containing a specific multilayer liposome in dispersed state and a contrasting agent dissolved in the aqueous phase in the liposome and the aqueous medium out of the liposome at the same concentrations, durable to autoclave sterilization, having excellent stability and suitable for injection, etc.

CONSTITUTION: The objective diagnostic composition is composed of an ionic aqueous medium, etc., containing dispersed multilayer liposome particles (which may contain single-layer liposome) consisting of a neutral phospholipid containing a 14-28C saturated fatty acid residue such as phosphatidylcholine and a charged phospholipid such as phosphatidylserine and having an average particle diameter of 50-3,000 nm, preferably 150-1,000 nm. A contrasting agent for X-ray examination, magnetic resonance image examination, ultrasonic contrasting, etc., is dissolved in the aqueous phase in the liposome and in the aqueous medium out of the liposome at the same concentrations. The weight ratio of the neutral phospholipid to the charged phospholipid is (60-4)/1.

LEGAL STATUS

[Date of request for examination]

16.02.2001

[Date of sending the examiner's decision of rejection]

[Kind of final disposal of application other than the examiner's decision of rejection or application converted registration]

[Date of final disposal for application]

[Patent number]

[Date of registration]

[Number of appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of requesting appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of extinction of right]

Copyright (C); 1998,2003 Japan Patent Office

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開平7-316079

(43) 公開日 平成7年(1995)12月5日

(51) Int.Cl. ⁸	識別記号	庁内整理番号	F I	技術表示箇所
A 6 1 K 49/00	C			
9/127	F			
	M			
47/24	D			
49/04	K			

審査請求 未請求 請求項の数27 O L (全 12 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願平7-68177	(71) 出願人	000002831 第一製薬株式会社 東京都中央区日本橋3丁目14番10号
(22) 出願日	平成7年(1995)3月27日	(71) 出願人	594053095 ニコメド イマギング アクスイエ セル スカブ ノルウェー国, エン-0411 オスロ, トル ショブ, ビー, オー, ボックス 4220, ニ コペイエン 2
(31) 優先権主張番号	特願平6-57480	(72) 発明者	菊池 寛 東京都江戸川区北葛西1丁目16番13号 第 一製薬株式会社東京研究開発センター内
(32) 優先日	平6(1994)3月28日	(74) 代理人	弁理士 石田 敬 (外3名)
(33) 優先権主張国	日本 (J P)		最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 リボソーム

(57) 【要約】

【目的】 X線、MRI及び超音波造影のための改良された造影剤の提供。

【構成】 中性リン脂質及び荷電リン脂質とから成り平均粒径が50～3000nmの多重層リボソーム（一枚膜リボソームが共存していてもよい）が分散した水性媒体から成り、リボソーム中の水性相及びリボソーム外の水性媒体に同濃度の造影剤が溶解している、診断用リボソーム製剤。

【効果】 安定性が高く、且つオートクレーブ滅菌が可能である。

【特許請求の範囲】

【請求項1】 多重層リボソームを含有し且つ水性媒体中に懸濁した少なくとも1種の造影剤を含有するヒト又は動物に投与するための診断用組成物であって、該組成物は場合によって一枚膜リボソームが共存することもあり前記リボソームは中性リン脂質及び荷電リン脂質から成り、該リボソームの平均粒子直径は50～3000nmであり、そして該リボソームの内部を満たす水性相中の造影剤の濃度が、リボソームがその中に懸濁している水性媒体中のそれと実質的に同じであることを特徴とする診断用組成物。

【請求項2】 前記リボソームが懸濁している水性媒体がイオン性である、請求項1に記載の診断用組成物。

【請求項3】 前記中性リン脂質及び／又は荷電リン脂質が、少なくとも14個の炭素原子を含有する実質的に飽和された脂肪酸残基を含んで成る、請求項1に記載の診断用組成物。

【請求項4】 前記中性リン脂質及び／又は荷電リン脂質の脂肪酸残基が28個以下の炭素原子を含有する、請求項1に記載の診断用組成物。

【請求項5】 前記中性リン脂質がホスファチジルコリンである、請求項1～4のいずれか1項に記載の診断用組成物。

【請求項6】 前記荷電したリン脂質がホスファチジルセリン、ホスファチジルグリセロール、ホスファチジリンイノシトール、ホスファチジン酸、又はホスファチジン酸とアミノアルコールとのエステルである、請求項1～5のいずれか1項に記載の診断用組成物。

【請求項7】 ホスファチジル基が合成又は半合成のジバルミトイルホスファチジル又はジステアロイルホスファチジル基である、請求項5又は6に記載の診断用組成物。

【請求項8】 前記リボソームの平均粒子直径が150nm～1000nmである、請求項1～7のいずれか1項に記載の診断用組成物。

【請求項9】 前記リボソームの封入容量が少なくとも5ml/gである、請求項1～8のいずれか1項に記載の診断用組成物。

【請求項10】 前記リボソームの封入容量が少なくとも6ml/gである、請求項9に記載の診断用組成物。

【請求項11】 前記中性リン脂質と荷電リン脂質との重量比が60:1～4:1である、請求項1～10のいずれか1項に記載の診断用組成物。

【請求項12】 全脂質の濃度が20mg/ml～100mg/mlである、請求項1～11のいずれか1項に記載の診断用組成物。

【請求項13】 全脂質の濃度が50mg/ml～80mg/mlである、請求項1～12のいずれか1項に記載の診断用組成物。

【請求項14】 前記造影剤がX線、磁気共鳴画像(M

R1)又は超音波造影剤である、請求項1～13のいずれか1項に記載の診断用組成物。

【請求項15】 前記X線造影剤が1又は複数のイオン化フェニル基又は重金属クラスターもしくはキレートである、請求項14に記載の診断用組成物。

【請求項16】 前記造影剤がイオジキサノールである、請求項1に記載の診断用組成物。

【請求項17】 前記造影剤が磁気共鳴画像(MRI)造影剤である請求項15に記載の診断用組成物。

【請求項18】 前記磁気共鳴画像造影剤がマンガンである、請求項17に記載の診断用組成物。

【請求項19】 前記磁気共鳴画像造影剤がガドリニウムキレートである、請求項17に記載の診断用組成物。

【請求項20】 前記磁気共鳴画像造影剤がリボソーム膜に共有結合している、請求項17に記載の診断用組成物。

【請求項21】 超音波造影剤を含有するリボソームを含んで成り、そして全脂質濃度が少なくとも20mg/mlである、診断用組成物。

【請求項22】 前記超音波造影剤が体温において気体である、請求項1又は21に記載の診断用組成物。

【請求項23】 前記超音波造影剤が、生体内で気体を形成する液体、固体又は半固体の化合物である、請求項22に記載の診断用組成物。

【請求項24】 診断用組成物の製造方法において、中性リン脂質及び荷電リン脂質を溶剤中に溶解し、溶剤を除去して残渣を得、そして前記残渣を造影剤含有水溶液と混合し、そして造影剤を封入するリボソームを形成することを特徴とする方法。

【請求項25】 前記のごとくして形成されたリボソームをメンブランフィルターを通して押し出し、リボソームの粒子径を小さくすることを特徴とする請求項24に記載の方法。

【請求項26】 請求項1に記載の診断用組成物を用いた生体の診断方法。

【請求項27】 請求項1～26のいずれか1項に記載された診断用組成物を無菌製剤とするためのオートクレーブ滅菌。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【産業上の利用分野】本発明は1又は複数の造影剤を封入したリボソームを含んで成る注射用の診断用組成物に関する。

【0002】

【従来の技術】造影剤は画像のコントラストを増強するために様々な分野の画像診断において使用されており、それらのうちの最も重要なものはX線画像診断、磁気共鳴画像診断(MRI)、超音波画像診断および核医学画像(Nuclear Medicine Imaging)診断である。

【0003】コンピューター断層撮影 (CT) やデジタルサブトラクションアンギオグラフィ (DSA) などの応用を含むX線画像診断では、造影は電子密度の差を基にしている。現在使用されているX線造影剤は一般に重元素を基剤としており、その例として胃腸系の視覚化を増進するのに用いることができる硫酸バリウムなどのバリウム塩、胃腸系の視覚化や非経口投与に用いることができるヨウド系造影剤が挙げられる。

【0004】ヨウド系X線造影剤は、最も一般的にはヨウ化フェニル基を含み、典型的には3位および/または5位にカルボキシル、カルバモイル、N-アルキルカルバモイル、N-ヒドロキシアルキルカルバモイル、アシルアミノ、N-アルキルアシルアミノおよびアシルアミノメチルから成る群から選ばれた基を有する2, 4, 6-トリヨードフェニル基を少なくとも1個持つ。この型のイオン性X線造影剤としては、メトリゾ酸、ジアトリアゾ酸、イオタラム酸、イオキサグル酸およびそれらの酸の塩が挙げられる。

【0005】浸透圧が低くその結果として血行力学作用が低いためにイオン性造影剤よりも一般に実質的に毒性が低い非イオン性ヨウド系造影剤としては、イオヘキソール、イオベントール、イオバミドール、イोजキサノール、イオプロミド、イオトロランおよびメトリザミドが挙げられる。例えばイोजキサノールやイオトロランといったいわゆる二量体もそれらの中に含まれ、それらはその等張化によって300mgI/mlを越える濃度で血液と等張になるように製剤化することができる。

【0006】最近、重金属クラスター/キレートを経口用X線造影剤が着目されている。例えば、WO-A-9114460とWO-A-9217215を参照のこと。親水性の点から見て、前述のX線造影剤はいずれもほぼ同じ細胞外生体分布を有し、従って類似した臨床上の適応を示し、腎で排出される。従ってより一層臓器特異的な造影剤を見出す試みがなされている。例えば、ヨウ素化フェニル基がデンプンなどの高分子支持体に結合された。

【0007】生体内で分解可能な粒子を基にした可能性ある肝造影剤が提唱され (例えばWO-A-8900988とWO-A-9007491を参照のこと)、イオン性または非イオン性のX線造影剤を含有するリボソームが提案された (下記参照)。そのような製剤は安定性や毒性の問題のためまだ販売されていなし後期の臨床開発段階に達しておらず、従ってより安定で無毒で且つ臓器特異的なX線造影剤への要求はいまだ満たされていない。

【0008】造影剤によって操作することができるMRIの主たる造影パラメーターは、スピン-格子緩和時間 (T_1) とスピン-スピン緩和時間 (T_2) である。例えばマンガン ($2+$)、ガドリニウム ($3+$) および鉄

($3+$) を基剤とした常磁性キレートはスピン-格子緩和時間 (T_1) を減少させ、それによってシグナル強度を増加させる。磁性/超常磁性粒子を基剤としたMRI造影剤はスピン-スピン緩和時間 (T_2) を減少させ、シグナル強度の減少を引き起こす。

【0009】ジスプロシウムを基剤とした常磁性キレートや常磁性化合物の大投与量もまたMRIシグナル強度を減少させるだろう。MRI造影剤 (その幾つかは開発中であるかまたは市販されている) の総説については、例えばD.D.Stark およびW.G.Bradley: Magnetic Resonance Imaging, Mosby 1992, Chapter 14を参照のこと。

【0010】GdDTPA, GdDOTA, GdHPDO3AおよびGdDTPA-BMAといった親水性キレートは細胞外に分布され腎で排出される。そのような化合物は、例えば、中枢神経系の病変を視覚化するのに有用である。他に、より一層臓器または組織特異的な薬剤としては、MnDPDP, GdBOPA, GdEOB-DTPA, 常磁性ポルフィリン、高分子化合物、粒状物およびリボソームが挙げられる。

【0011】よって様々な常磁性金属イオンやキレートがリボソーム中に封入されている。例えば、多様な脂質組成、表面電荷および大きさを有する小さな一枚膜リボソーム (SUV)、大きな一枚膜リボソーム (LUV) および多重層リボソーム (MLV) がMRI造影剤として提案されている [例えば、S.E.Seltzer, Radiology 171 (1989) p. 19; S.E.Seltzer 他, Invest. Radiol. 23 (1988) p.131; C.Tilcock 他, Radiology 171 (1989) p.77; C.Tilcock 他, Biochim Biophys. Acta 1022 (1990) p.181; E.C.Unger 他, Invest. Radiol. 25 (1990) p.638; E.C. Unger 他, Invest. Radiol. 23 (1988) p.928; E.C.Unger 他, Radiology 171 (1989) p.81; E.C.Unger 他, Magn. Reson. Imaging 7 (1989) p.417 およびJ.Vion-Dury 他, J. Pharmacol. Exp. Ther. 250 (1989) p.1113を参照のこと]。しかしながら、リボソームMRI造影剤に関する豊富な報告にもかかわらず、そのような製品は1つも今日市販されていないし、また後期臨床開発段階にない。

【0012】超音波画像診断は、例えば1~10MHzの周波数域の超音波を、変換器を介して人間または動物被検体中に浸透させ、超音波が体組織や体液の界面と相互作用することに基づいている。超音波画像の造影はそのような界面における音波の示差的反射/吸収に由来する。血流を評価するためのカラードブラ (Colour Doppler) の使用を含むドップラー技法を使って結果を倍増させることができる。

【0013】造影剤を使って異なる組織/体液の音響特性の差を増幅せしめることが有利であるだろうと長い間理解されており、そして最初の超音波造影剤として1968年にインドシアニングリーンが使われて以来、可能性ある造影誘導剤が他に多数実験されている。それらとしては、エマルジョン、固体粒状物、水溶性化合物、遊

離気泡および様々な型の封入気体含有系が挙げられる。造影剤が生ずる音響の後方散乱の点から容易に圧縮できる低密度造影剤が特に効果的であることが一般に認められている。よって気体含有系および気体発生系は他の型の造影剤よりも著しく大きい効能を示す傾向がある。

【0014】3つの超音波造影剤が現在市販されているかまたは後期臨床開発段階にある。それらは気体含有ガラクトース微結晶を基剤としたEchovist（商標）、脂肪酸でコーティングした気体含有ガラクトース微結晶を含んで成るLevovist（商標）、および部分変性されたヒト血清アルブミンにより封入された気泡を含んで成るInfoson（商標）である。しかしながら、短い造影半減期（すなわち生体内での安定性の相対的欠失）および／または限定された貯蔵安定性のため、それらの剤の臨床用途は制限される。

【0015】従って、優れた貯蔵安定性と生体内安定性（好ましくは心臓および非心臓灌流分析の場合には少なくとも数回の循環の通過の間）を合わせ持つ超音波造影剤、特に心臓および非心臓灌流研究用の超音波造影剤への要求が引き続き存在している。

【0016】

【発明が解決しようとする課題】リボソーム製剤の使用や様々な型の造影剤の組織または臓器特異性を増加させる他の技術を提案する多数の刊行物にもかかわらず、市販されているかまたは後期臨床開発段階にあるこの種の製品は現在1つもない。これは低い封入率、毒性、不十分な貯蔵安定性および／または生体内での不安定性または短い造影半減期に関する問題の結果であると考えられる。従ってそれらの問題を解決する造影剤への要求が残存している。超音波画像診断の分野では、心臓および非心臓灌流での使用のため十分に高い生体内安定性を示す造影剤、および効率的な肝画像診断を可能にするのに十分安定である製剤への特別な要求が存在する。

【0017】一般に、脂質可溶性薬剤はリボソーム中に容易に封入される。他方、水溶性薬剤のうち水溶性電解質は、薬剤の電荷と荷電した脂質の電荷の相互作用により（特開平2-187370）またはリボソームの外側と内側のpH勾配により（WPI 88-271022/38）リボソームの内部水相中に封入することができる。

【0018】しかしながら、上記方法を使っても封入される薬剤の量はそれ程多くない。特に、薬剤が水溶性非電解質物質である場合、上述の手段を適用することはできず、従ってリボソーム中に水溶性非電解質を効率的に封入することは容易ではない。水溶性非電解質を効率的にリボソームの内部水相中に封入するための手段として、逆相蒸発法（Proc.Natl.Acad.Sci.USA, 75(9) 巻、4194頁、1978）、エーテル注入法（同書、443巻、629頁、1975）等が提唱された。

【0019】しかしながら、そのような方法は低い発火

点を有するエーテルを使用するため、多量のリボソームの工業生産に利用することができない。更に、それらの方法によって製造されるリボソームは主に一枚膜リボソームである。多重層リボソームに比べると、一枚膜リボソームは血中での安定性が低いという欠点を有する。

【0020】国際特許出願W88/09165は、リボソーム中のX線造影剤溶液及びリボソームが懸濁されている緩衝化生理食塩水連続相を含む注射用リボソーム調製物を記載している。X線造影剤を含有する水性媒体中にリボソームが形成されるが、注射のためにはそれを遠心分離により単離し、そして緩衝液に再懸濁しなければならない。注射用無菌組成物を調製するためにリボソーム調製物をオートクレーブ滅菌することができれば非常に便利である。無菌条件下で混合物の個々の成分から製剤を調製することは高コストであり確実でない。又、該リボソーム懸濁液は濾過滅菌も可能であるが、そのような滅菌法はリボソームの粒子径を小さくし、その結果保持率も低くなる。

【0021】更に、オートクレーブ温度（121℃）より非常に低い相転移温度（Tc）を有するため、リボソーム懸濁液のオートクレーブ処理は成功しなかった。すなわち、リボソームの内部にのみX線造影剤を有する、W88/09165のリボソーム調製物のときリボソーム調製物をオートクレーブ殺菌する際に、X線造影剤がリボソームから出てしまうことを本発明者らは見出した。本発明者らはまた、リボソームの外側の溶解したX線造影剤の濃度が脂質層の内水相のそれと実質的に同一であるような、連続相中のリボソームをオートクレーブ滅菌することにより、上記の問題を回避することができることを見出した。この様なオートクレーブ滅菌は通常、冷却及び貯蔵の後注射の直前に開放されるまで維持されるシールされた容器中で行われる。

【0022】本発明はまた、リボソーム膜を形成するために中性脂質及び荷電脂質を使用し、そしてリボソームの平均粒子径を比較的小さく、例えば50～300nmのサイズ範囲に保つことにより、封入効率、毒性、製造工程及び／又は製品寿命に関して、造影における使用のためにリボソーム造影剤が改良され得るという知見に基いている。このリボソームは、例えば5ml/g以上の高い封入容量をもたらすリボソーム膜間の静電的反発を提供する正味負電荷又は正味正電荷を担持する。

【0023】本発明の1つの特徴によれば、本発明者らは、多重層リボソームを含有し且つ水性媒体中に懸濁した少なくとも1種の造影剤を含有するヒト又は動物に投与するための診断組成物であって、該組成物は場合によって一枚膜リボソームが共存することもあり、前記リボソームは中性リン脂質及び荷電リン脂質から成り、該リボソームの平均粒子径は50～3000nmであり、そして該リボソームの内部を満ちす水性相中の造影剤の濃度が、リボソームがその中に懸濁している水性媒体中のそ

れと同じであることを特徴とする診断組成物を提供する。

【0024】従って、液で満たされたリボソームを含んで成る本発明の組成物は、肝臓及び脾臓に集りそしてこれらの造影を助ける造影剤を含んで成るリボソームと共に、全身的造影剤として常用の血液ブール造影要求を満たす常用の造影媒体の外部連続相を含んで成る。本発明のリボソーム懸濁液は、内部水相での高い封入容量（例えば5ml/g以上、好ましくは6ml/g以上）を有し、そしてそれ故に多量の水性薬物を保持することができ、そして血液中及び貯蔵の際並びにオートクレーブ滅菌に対して安定である。

【0025】X線画像診断に使われる本発明の組成物は、例えば、当業界で公知である例えば上述したようなヨウ素系X線造影剤および重金属クラスター／キレートX線造影剤のいずれも取り込むことができる。本発明の組成物中のヨウ素系X線造影剤は、好ましくは1分子あたり3個以上のヨウ素原子を含有し、そして通常1個又は複数個のヨード化されたフェニル基を含有する。非イオン性造影剤、特に高度に親水性であり且つ高濃度でも低い浸透圧しか生じないいわゆる非イオン性二量体、例えばイオジキサノールやイオトロランが好ましい。組成物中の該造影剤の濃度は広範囲に異なることができ、該造影剤の性質、意図する最終組成物の投与経路および臨床上の指標といった因子により影響されるだろう。

【0026】典型的な濃度は、例えば、組成物1mlあたり封入ヨウ素10～300mg（好ましくは60～180mg、さらに好ましくは70～110mg）の範囲内であろう。組成物ml当りの全ヨウ素の濃度は好ましくは40～450mg、さらに好ましくは160～320mgである。本発明の組成物は通常静脈内に投与され、その投与量も同様に例えば臨床上の指標に応じて広範囲に異なることができるが、一般には血管または肝臓画像診断に典型的な用量は、例えば体重1kgあたりヨウ素5～300mgの範囲内であることができる。

【0027】本発明のリボソーム製剤中の重金属クラスター／キレートは、好ましくはヨウ素の原子番号よりも大きい原子番号を有する少なくとも2つの金属原子を含む。この型の代表的造影剤としては、例えば、WO-A-9114460およびWO-A-9217215中に記載されたタングステンクラスター／キレートが挙げられる。非イオン性クラスター／キレートが好ましいだろう。

【0028】MR画像診断用の本発明の組成物は、例えば、当業界において公知の例えば上述したような常磁性剤のいずれも含むことができる。そのような常磁性造影剤は、例えば、小胞中に封入するかまたは共有結合させることができ、あるいは脂質膜中に非共有結合的に取り込むことができる。

【0029】常磁性造影剤は、例えば、生理学的に許容

される常磁性金属塩もしくはキレートであることができ、または遊離基、好ましくはニトロキシド型の遊離基を含むことができる。常磁性剤が遊離金属イオンである場合、マンガン(2+)塩が好ましい。キレートは好ましくはマンガン(2+)、ガドリニウム(3+)、ジスプロシウム(3+)または鉄(3+)を基礎にしており、文献（例えばWO-A-9110645を参照のこと）中に記載されたようなキレート化剤、例えばNTA、EDTA、HEDTA、DTPA、DTPA-BMA、BOPTA、TTHA、NOTA、DOTA、DO3A、HP-DO3A、EOB-DTPA、TETA、HAM、DPDP、ポルフィリンおよびそれらの誘導体を含むことができる。

【0030】組成物中のそのような常磁性剤の濃度は、例えば、1mM～0.5Mの範囲内であることができる。本発明のMR画像診断用組成物は、通常静脈内に投与され、その典型的な用量は、例えば、体重1kgあたり封入金属キレート0.02ミリモルであろう。上記と同様、濃度と用量は該常磁性剤の性質、意図する投与経路および臨床上の指標といった因子により影響されるだろう。

【0031】MR画像診断用のリボソーム製剤はまた、例えば封入により、超常磁性剤または強磁性剤、例えば当業界で公知のもの、も含むことができる。この型の好ましい剤としては、磁鉄鉱、 γ -Fe₂O₃、混合フェライト、および有機強磁性材料を包含する磁性を有する他の鉄含有化合物が挙げられる。封入される剤は、遊離であるかまたは例えばデキストラン、脂肪酸もしくは磁性材料を安定化することが知られている他の生体に無害な化合物でコーティングすることができる。生成物が非経口用である場合、該コーティング皮膜は生体内で分解されなければならない。該剤は4nm～1μm、好ましくは4～40nmの範囲内の粒径を有する粒子の水性懸濁液の形であるのが好都合である。

【0032】そのような診断剤の濃度は、例えば0.01mM～0.1Mの範囲内であることができ、その用量は薬剤の性質、その生体分布および臨床上の指標により影響されるだろう。血管画像診断（灌流を含む）または肝画像診断用の典型的用量は、例えば、静脈内投与の場合体重1kgあたり封入された鉄0.1～100μモルの範囲内であることができる。超音波画像診断用のリボソーム組成物は、ドップラー技術を包含するあらゆる型の超音波技術において用いることができる。そのような組成物は、好ましくは生理学的に許容される気体が中に封入されているリボソームまたは気体前駆体の中に封入されているか共有結合されているリボソームを含んで成る。

【0033】一般にいずれの生体適合性気体でも本発明に係る超音波組成物中に存在することができ、例えば空気、窒素、酸素、水素、亜酸化窒素、二酸化炭素、あるいはさらに好ましくは、水に不溶性の気体、例えばヘリウム、アルゴン、六フッ化硫黄、および任意にフッ素化

されることがある低分子量の炭化水素、例えばパーフルオロアルカン ($C_n \sim C_m$)、アセチレンまたは四フッ化炭素あるいはこれらの混合物が存在することができる。本明細書中で使用する「気体」なる用語は、37℃の正常体温で気体形態である任意物質を包含し、従ってジエチルエーテル又はある種のパーフルオロアルカン類のような低温で沸騰する液体を包含する。

【0034】気体前駆体としては、アミノマロン酸塩；炭酸塩および炭酸水素塩、例えば炭酸リチウム、炭酸水素リチウム、炭酸ナトリウム、炭酸水素ナトリウム、炭酸アンモニウム、炭酸カルシウムおよび炭酸水素マグネシウム；生理学的に許容されるジアゾニウム化合物； $CO-O-CR^1R^2-O-CO-OR^3$ の型の基を含有する炭酸エステル；並びにβ-ケト酸が挙げられる。

【0035】それらは様々な形式で反応して気体含有リボソームを生成することができる。例えば、炭酸塩と炭酸水素塩は投与後に体内で一般的である酸性pH値によって生体内で二酸化炭素を発生することができ；ジアゾニウム化合物は例えばUV光を照射すると窒素を発生することができ；炭酸エステルは生体内で非特異的エステラーゼと相互作用して二酸化炭素の発生をもたらす；β-ケト酸は自然に脱炭酸するであろう。

【0036】本発明に係る超音波組成物は、例えば、経口的または非経口的に投与することができるが、ファロービウス管のような体腔中への直接投与における特定適用に有利であるかもしれない。しかしながら一般には、心臓および心臓外灌流を包含する血管画像診断を増進するために、おそらく最も普通には静注による血管内投与が用いられるだろう。その安定性のため、そのように投与される組成物のほとんどが最終的には細網内皮細胞系による取込み、主として肝臓中への取込みを受け、良好な肝臓超音波造影強化を与えるだろう。

【0037】圧縮性の容易さは低密度超音波造影剤の望ましい性質である。本発明の組成物中のリボソームは本質的に非固体のマトリックスを含んで成るので、それらは相当な程度の柔軟性を示すだろう。これは従って圧縮性を増加させ、それにより本発明の気体充填型超音波組成物のエコー源性 (echogenicity) を増加させるだろう。

【0038】本発明のリボソームの膜形成のための必須成分の1つは、実質的に飽和された脂肪酸残基を含んで成る中性リン脂質である。脂肪酸残基中の炭素原子の数は通常少なくとも14、好ましくは少なくとも15、より好ましくは少なくとも16である。脂肪酸残基中の炭素原子の数が14未満であると、内部水相を収容するリボソームの能力は低く、投与後の血中でのリボソームの安定性も低い。他方、通常、脂肪酸残基中の炭素原子の数が28以上であると、生体適合性が低くなり、リボソームの製造時に非常に高い温度が必要となる。

【0039】「実質的に飽和された」という用語は、使

用する中性リン脂質中の脂肪酸残基が完全に飽和されている ($C-C$ 二重結合を全く含まない) か、または不飽和の程度が非常に低いことを意味する。実質的に飽和されている脂肪酸残基よりなる中性リン脂質については、ヨウ素価によって示される不飽和度が20以下であり、好ましくはヨウ素価が10以下であることが必要である。不飽和度が高すぎると、保持率が低くなり、又リボソームが容易に酸化され、加熱滅菌するのが困難になる。

10 【0040】本発明において使われる中性リン脂質は、例えば中性グリセロリン脂質、例えば、部分的にもしくは完全に水素添加された天然、例えば大豆もしくは卵黄由来、または合成のホスファチジルコリン、特に半合成または合成のジバルミトイルホスファチジルコリン (DPPC) またはジステアロイルホスファチジルコリン (DSPC) を好ましい例としてあげることができる。

【0041】本発明のリボソームの膜形成のための必須成分のもう1つは、実質的に飽和された脂肪酸残基を含んで成る荷電リン脂質である。脂肪酸残基中の炭素原子の数は通常少なくとも14、好ましくは少なくとも15、より好ましくは少なくとも16である。脂肪酸残基中の炭素原子の数が14未満であると、内部水相を収容するリボソームの能力は低く、投与後の血中でのリボソームの安定性も低い。他方、通常、脂肪酸残基中の炭素原子の数が28以上であると、生体適合性が低くなり、リボソームの製造時に非常に高い温度が必要となる。

【0042】「実質的に飽和された」という用語は、使用する荷電リン脂質の脂肪酸残基が完全に飽和されている ($C-C$ 二重結合を全く含まない) か、または不飽和の程度が非常に低いことを意味する。実質的に飽和されている脂肪酸残基よりなる荷電リン脂質については、ヨウ素価によって示される不飽和度が20以下であり、好ましくはヨウ素価が10以下であることが必要である。不飽和度が高すぎると、保持率が低くなり、又リボソームが容易に酸化され、加熱滅菌するのが困難になる。

【0043】本発明において使われる荷電リン脂質は、例えば正または負に荷電したグリセロリン脂質である。負に荷電したリン脂質としては、例えば、ホスファチジルセリン、例えば部分的にもしくは完全に水素添加された天然、例えば大豆もしくは卵黄由来、または半合成のホスファチジルセリン、特に半合成または合成のジバルミトイルホスファチジルセリン (DPPS) またはジステアロイルホスファチジルセリン (DSPS) を；

40 【0044】ホスファチジルグリセロール、例えば部分的にもしくは完全に水素添加された天然 (例えば大豆または卵黄由来) または半合成のホスファチジルグリセロール、特に半合成または合成のジバルミトイルホスファチジルグリセロール (DPPG) またはジステアロイルホスファチジルグリセロール (DSPG) を；ホスファチジイルノシトール、例えば部分的にもしくは完全に水

素添加された天然（例えば大豆または卵黄由来）または半合成のホスファチジルイノシトール、特に半合成または合成のジバルミトイルホスファチジルイノシトール（DPP I）またはジステアロイルホスファチジルイノシトール（DSP I）を；

【0045】ホスファチジン酸、例えば部分的にもしくは完全に水素添加された天然（例えば大豆または卵黄由来）または半合成のホスファチジン酸、特に半合成または合成のジバルミトイルホスファチジン酸（DPPA）またはジステアロイルホスファチジン酸（DSP A）が挙げられる。このような荷電リン脂質は通常単独で使用されるが、2種以上使用してもよい。但し、2種以上使用した場合には、負電荷のリン脂質同士又は正電荷のリン脂質同士で使用する事が、リボソームの凝集防止の観点から望ましい。

【0046】正に荷電したリン脂質は、例えば、ホスファチジン酸とアミノアルコールとのエステル、例えばジバルミトイルホスファチジン酸またはジステアロイルホスファチジン酸とヒドロキシエチレンジアミンとのエステルを好ましい例としてあげることができる。本発明によれば、中性リン脂質と荷電したリン脂質の重量比は、通常は200:1~3:1、好ましくは60:1~4:1、より好ましくは40:1~5:1、例えば約10:1である。

【0047】本発明のリボソームは、上述の2つの必須成分に加えて様々な任意化合物を含むことができる。例えば、酸化防止剤としてビタミンE（ α -トコフェロール）および/またはビタミンE酢酸エステルを脂質の総量に関して0.01~2モル%、好ましくは0.1~1モル%の量で添加することができる。このような脂質からなる本発明のリボソームからなる診断用組成物においては、総脂質濃度として一般に20mg/ml~100mg/ml、好ましくは40mg/ml~90mg/ml、更に好ましくは50mg/ml~80mg/mlとすることが造影剤のリボソーム内への保持率の向上の点から好ましい。

【0048】上述の造影剤は、投与後にリボソームが体内に安定に維持されるように、好ましくは等張溶液または懸濁液（体内の生理学的浸透圧に関して）の形でリボソーム中に封入される。媒質として、水、緩衝液、例えばTris-HCl緩衝液、リン酸緩衝液、クエン酸緩衝液等を使うことができる。

【0049】室温での好ましいpH範囲は6.5~8.5、さらに好ましくは6.8~7.8である。X線造影剤が多ヒドロキシル基を担持する非イオン性造影剤、例えばイオヘキソール、イオジキサノール又はイオパミドールである場合、緩衝液は好ましくは、米国特許No. 4278654に記載されているような、負の温度係数を有するものである。アミン緩衝液は要求される性質を有しており、好ましくはTRISである。このタイプの緩衝液はオートクレーブ温度において低いpHを有し、この

ことがオートクレーブ中のX線造影剤の安定性を増し、他方室温においては生理的に一層許容されるpHにもどる。

【0050】等張溶液または懸濁液を得るためには、等張溶液を提供する濃度で造影剤を媒質中に溶解または懸濁させる。例えば造影剤の溶解性が低いために造影剤が単独では等張溶液を提供できない場合、等張溶液が形成されるように他の非毒性水溶性物質、例えば塩化ナトリウムの如き塩類、マンニトール、グルコース、ショ糖、ソルビトール等の糖類を媒質に添加することができる。

【0051】上述のごとく、本発明の組成物の1つの利点はオートクレーブに対して耐えることである。これらは、その脂質組成のためによい封入容量及び封入率を有する。又、後述する如く、本発明のリボソームからなる診断用組成物は優れた造影効果を有すると共に、副作用の面でも優れている。

【0052】次に、本発明のリボソームの製造方法について説明する。本発明のリボソームは、多重層リボソームの形成に使われる常法によって製造することができる。それらの方法としては、Bangham法（J.Mol. Biol. 13, 238-252, 1965）、多価アルコール法（特公平4-36734）、脂質溶解法（特公平4-36735）、メカノケミカル法（特公平4-28412）が挙げられる。

【0053】一般的には、上記のごときリン脂質をクロロホルム、メタノール、ジクロロメタン、エタノール等の揮発性有機溶媒や該有機溶媒と水との混合溶媒に溶解の後、該溶媒を除去し、得られる残渣と造影剤を含有した水相とを混合し、振とうまたは攪拌することにより、目的とする多重層リボソームを製造することができる。

該製造法における溶媒の除去工程につき、除去手段としてエバポレーションを用いた場合には該製造法はバンガム法となり、また噴霧乾燥を用いた場合には上記製造法は噴霧乾燥法となり、更に凍結乾燥を用いることも可能である。

【0054】上記のごときリボソームの製造法において、脂質に対する溶媒の使用量は特に限定されず、脂質を十分溶解できる量であればよい。得られた脂質と溶媒との混合物より、エバポレーションにより溶媒を除去するには常法、具体的には減圧下、所望によっては不活性ガスの雰囲気下で溶媒を蒸発させればよく、その際具体的に使用する溶媒としては上記のごとき揮発性有機溶媒や該有機溶媒10容量部と多くとも水1容量部との混合溶媒を例示することができる。

【0055】また、凍結乾燥により溶媒を除去するには凍結温度を使用した溶媒の凝固点以下、一般的には-30~-50℃で凍結し次いで0.005~0.1 Torr程度の減圧条件で除去可能な溶媒を選択し、これを除去すればよい。更に、噴霧乾燥により溶媒を除去するには一般的には空気圧を1.0 kg/cm²、風量を0.35 cm³

／分とし、この時の入口温度は使用した溶媒の沸点以上とすればよく、例えば溶媒としてクロロホルムを使用した場合には60～90℃として、以下常法に従って溶媒を除去すればよい。

【0056】かくして得られた脂質の残渣を、用いた脂質の相転移温度(Tc)以上の温度で造影剤含有水溶液と混合し、次いで該Tc以上の温度で激しくもしくは穏やかに振とうもしくは攪拌することにより目的とするリボソーム及びその製剤を製造することができる。使用する水溶液の電解質イオン濃度は保持率等の点から可及的少量が望ましく、具体的には、薬物以外の陽イオン及び陰イオンを含めた総イオン濃度として約40mM以下、より好ましくは約20mM以下とすることが望ましい。リボソームの粒子径の表示としては一般に重量平均粒子径と個数平均粒子径が用いられるが、リボソームの保持容量の観点からは重量平均粒子径で表わすことが望ましい。

【0057】本発明のリボソームの重量平均粒子径は一般に50nm～3,000nm、好ましくは150nm～1000nm、より好ましくは200nm～500nmである。上記の所望の粒径を得るためには、予め決められたポアサイズを有するフィルターを通して大きい粒径のリボソームを濾過するという押出濾過法[Biochim.Biophys.Acta 557巻、第9頁(1979)]を使用すればよい。

【0058】本発明のリボソームは多重膜を有するリボソームを一定の比率で含む。一般に、上記の方法により最初に形成されたとき、リボソームは多重膜であるが、上記の好ましい技法によれば、リボソーム懸濁液は例えば約1ミクロンの孔サイズを有する1又は複数の微孔フィルターに通され、脂質の外層が除去されて一枚膜リボソーム及び多重層リボソームの混合物が残る。一般に、多重層リボソームの比率は30重量%以上であり、好ましくは40重量%以上である。多重層リボソームは安定性の点で幾つか利点を有するが、比較的大比率の一枚膜リボソームも許容される。一枚膜リボソームは多重層リボソームよりも大きい封入容量を提供するからである。

【0059】こうして調製したリボソームは水性媒質(外液)中の懸濁液として存在し、診断用組成物として利用される。リボソームの形成中にリボソームの中に封入されなかった造影剤の溶液は外液中に存在する。あるいは、リボソームの外側に存在する溶液を別の外液で置換することができるが、内液及び外液中の造影剤の濃度は同じであるべきである。いずれの場合にせよ、外液(分散媒)はリボソームの内部水相に対して等張であるのが好ましい。かくして製されたリボソーム懸濁液中における電解質イオン濃度は保存安定性や加熱滅菌での安定性の点から、可及的少量にすることが望ましく一般的には薬物以外の陽イオン及び陰イオンを含めた総イオン濃度として約40mM以下、より好ましくは約20mM以下とすることが望ましい。

【0060】本発明のリボソームの封入容量は少なくと

も5ml/g脂質、好ましくは少なくとも6ml/gである。本発明の方法によってヨウ素系X線造影剤を封入する時、比較的高いヨウ素／脂質比を有する生成物を与えることにより費用と潜在的毒性問題を削減するために、最初の水性溶液中の該造影剤の濃度は高い方が望ましい。しかしながら、本発明によれば、ヨウ素と脂質との重量比の好ましい範囲は1.3～1.45である。これは幾つかの従来技術の比率より低い。WO88/09165の場合、下限は1.5である。

【0061】本発明の最も好ましいX線造影組成物は中性リン脂質としての水素添加ホスファチジルコリン及び荷電脂質としての水素添加ホスファチジルセリンを、好ましくは10:1の比率で含んで成る。このような組成物は7ml/gを超える封入容量を有することができる。このような組成物において使用するための最も好ましいX線造影剤はイオジキサノールである。リボソームの内側及び外側の水性媒体は好ましくは約400mq/mlのイオジキサノール、並びにソルビトールのごとき浸透圧調節剤、EDTANa、-Caのごとき安定化剤及びTRIS緩衝剤(pH約7.4)を含有する。

【0062】MR画像診断用のリボソーム組成物は、この方法により、例えばGdHPD03Aのような常磁性MR造影剤の水溶液または例えば約10nmの粒度を有するFe₃O₄のような超常磁性MRI造影剤の水懸濁液を封入することにより、調製することができる。前記のような懸濁液は、例えば、鉄(2+)塩と鉄(3+)塩の混合物からの磁鉄鉱の制御沈澱により調製することができる。造影剤がリボソーム膜に共有結合されているリボソーム組成物は、例えば、US-A-5135737に記載のものと同様な方法を使って製造することができる。

【0063】超音波画像診断用の気体含有組成物は、様々な方法で、例えば気体含有一枚膜リボソームおよび多重層リボソームの調製について記載されているのと同様な技術を使って、調製することができる。そのような技術は、例えば、US-A-4544545、US-A-4900540、WO-A-9109629およびWO-A-9115244中に記載されている。例えば、pH感受性気体前駆体の溶液を封入し、次いで系のpHを変化させてリボソーム内部での気体の生成を促す。

【0064】そのような場合、膜を通過する水素イオンまたは水酸化イオンの輸送を助け、それによってpH変化を促進させるために、小胞の膜の中に1または複数のイオノホアを組み込んでおくことが有利であるかもしれない。例えば、上述のWO-A-9109629を参照のこと。あるいは、炭酸エステル溶液を非特異的ヒトエステラーゼと一緒に封入し、生じたリボソームを例えば37℃で5日間インキュベートしてもよい。その後、浮んでいる二酸化炭素含有小胞を分離し、適宜製剤すればよい。

【0065】気体含有小胞の他の製造方法は、水性媒質を封入している予め形成されたリボソームの懸濁液に気体の外圧を適用することを含む。一般に気体は非常に高圧で、例えば少なくとも約5気圧で適用されるだろう。

【0066】他の製造方法は、水性媒体、又はグリセロール及びポリエチレングリコールのごときリン脂質を安定化することが知られている水溶性生体受容性有機溶剤と水との混合物に、選択されたリン脂質を分散せしめ、そしてこの溶液を、選択された気体又は気体混合物の存在下で激しく攪拌することを含む。あるいは、前記リン脂質溶液を選択された気体又は気体混合物の存在下で超音波処理することによりリボソームを形成することもできる。本発明の超音波造影剤を製造するために任意の気体、例えば空気、窒素、酸素、水素、亜酸化窒素、二酸化炭素、又はさらに好ましくは水不溶性気体、例えばヘリウム、キセノン、アルゴン、六弗化硫黄、及び低分子量の場合によっては弗素化されている炭化水素、例えばメタン、アセチレン又は四弗化炭素、あるいはこれらの混合物を用いることができる。一般に、いずれかの画像診断方式で使われる本発明の組成物は、所望であればリボソームの循環半減期を増加させるためにポリエチレングリコールのような物質で改質せしめることができる。これは心血管画像診断を含む用途において特に有利であろう。下記の非限定的実施例は本発明を例証するためのものである。

【0067】

【実施例】

実験

(1) 粒径の測定

得られたリボソームの重量平均粒子径は、ダイナミック光散乱測定器DLS-700（大塚電子株式会社）を使って準弾性光散乱法によって測定した。

【0068】(2) 封入容量の測定

リボソームの内部水相の容積は、リボソーム製剤中に收容された水溶性非電解質であるイオジキサノールの比率により算出した。即ち、1mlのリボソーム製剤のうち内部水相の容積が0.4mlである時、イオジキサノールの封入率は40%である。封入容量はグラム単位の脂質あたりの内部水性相の容積として定義される。例えば、リボソーム製剤の脂質の濃度が0.056g/mlであり、リボソーム中イオジキサノールの封入率が40%である時、リボソーム1ml中に0.056gの脂質が0.4mlの内部水相を收容するので、封入容量は7.1ml/g脂質となる。

【0069】リボソーム製剤中のイオジキサノールの封入率はゲル濾過法によって測定した。すなわち、移動相として生理的食塩水を使ってゲル濾過カラム（担体：Pharmacia, Sephadex G50；カラム直径16mm；カラム高さ300mm）を通してリボソーム

製剤をゲル濾過し、溶出液を分画した（2.5ml/分画）。各分画より0.8mlを採取し、メタノール2mlを加えて攪拌した後、クロロホルム1mlを加えて攪拌し、いったん全体を澄明に溶解させた。

【0070】これにクロロホルム1mlを加えて攪拌し、更に蒸留水1.2mlを加えて攪拌後、冷却遠心分離機（久保田商事（株）KR-702型）にて遠心分離（3500rpm、10分、室温）し、分離した二層の上層（水及びメタノール相）に回収されるイオジキサノール濃度を246nmでの吸光度により測定した。溶出液中のイオジキサノール濃度が高い場合には、蒸留水にて適宜希釈した後、0.8mlを採取し、メタノール、クロロホルム及び蒸留水による抽出操作を行った。

【0071】Void volumeに溶出するリボソーム分画中のイオジキサノール量を溶出液に回収されたイオジキサノール量の総量（25フラクションまでに回収されたイオジキサノール量）で除し、主葉保持率とした。なおリボソーム分画の終点は、イオジキサノール濃度が極小となる分画とした。

20 【0072】実施例1：X線造影剤イオジキサノールの封入

卵黄由来の水素添加ホスファチジルコリン（HEPC）0.640g、HEPCから合成した水素添加ホスファチジルセリン（HEPS）0.064g、およびクロロホルムとメタノールと水の混合物（重量比100：20：0.1）60mlをフラスコ中で混合した。この混合物を湯浴（65℃）上で加熱してリン脂質を溶解させ、そして生じた溶液をロータリーエバポレーター中で60℃で加熱して溶剤を蒸発させた。

30 【0073】残渣を更に2時間真空乾燥し、脂質フィルムを形成せしめた。イオジキサノール（1,3-ビス（アセチルアミノ）-N,N'-ビス〔3,5-ビス（2,3-ジヒドロキシプロピルアミノカルボニル）-2,4,6-トリヨードフェニル〕-2-ヒドロキシプロパン0.4g/ml）とショ糖（0.05g/ml）を含む水溶液を65℃に加熱し、この加熱した溶液10mlを脂質フィルムと混合し、この混合物を65℃に加熱しながらミキサーで10分間攪拌した。この混合物を1.0μmのポアサイズを有するポリカーボネートメンブランフィルターを通して加圧下で1回濾過し、多重層リボソーム（MLV）を調製した。

【0074】こうして調製したMLVをガラスバイアル中に入れ、121℃で20分間オートクレーブ滅菌した。その結果を表1に示す。尚、保持容量の測定は、実験例の（3）と同様に行なった。重量平均粒子径の測定は実験例の（1）と同様に行なった。

【0075】

【表1】

表 1

	オートクレーブ滅菌前	オートクレーブ滅菌後
粒径(nm) (平均±S. D.)	260±116	251±120
封入容量 (ml/g 脂質)	6.4	6.5
ヨウ素/脂質 重量比	1.3	1.3
保持率(%)	45.1	45.8

【0076】実施例2：イोजキサノールの封入

*【0077】

実施例1に記載の方法に従って、イोजキサノールを含むリボソーム製剤を調製した。結果を表2に示す。*

【表2】

表 2

製剤中の濃度 (mg/ml)			粒径(nm) (平均±S. D.)		封入容量 (ml/g 脂質)		ヨウ素/脂質 重量比	
HEPC	HBPS	イोजキサノール	AC前	AC後	AC前	AC後	AC前	AC後
64.0	6.4	400	260±116	251±120	6.4	6.5	1.3	1.3
64.0	6.4	200	273±125	275±118	7.8	8.0	0.8	0.8

注：AC＝オートクレーブ滅菌

実施例3. 実施例1で得られたリボソーム懸濁液を等張グルコースにより希釈して50mq封入ヨウ素/mlの濃度とした。希釈の後、懸濁液は乳白色に変わった。この乳濁液の顕微鏡分析の際にリボソームの凝集体は観察されなかった。乳濁液を1年間貯蔵した後、封入されたイोजキサノールの量及びサイズ分布への影響は観察されなかった。

【0078】実施例4. 実施例3の乳濁液をラットに静脈内注射した。封入されたイोजキサノールの大部分が、注射後に肝臓に分布することを確認したが、脾臓にも高濃度のイोजキサノール濃度が検出された。注射後、組織に分布したイोजキサノールは時間と共に減少し、最終的にはこれら2つの器官中にイोजキサノールは見られなくなった。他のすべての器官のイोजキサノールのレベルは血中イोजキサノールのレベルと平行して低下した。注射されたイोजキサノールの大部分は尿中に回収された。

【0079】実施例5. 実施例3の乳濁液を多数の肝癌転移を有するラットに静脈内注射した。封入ヨウ素50mq及び100mq/kgの投与量において、それぞれ42及び62HUCT値のX線減衰が肝臓の正常領域で観察されたが、腫瘍転移部での減衰への影響は最小であった。肉視的観察により、検出された腫瘍が直径5mm未満であるこ

とが示された。

【0080】実施例6. 実施例3の乳濁液を、封入ヨウ素200～7500mq/kg体重の投与量においてマウスの群に静脈内注射した。体重増加及び死亡を14日間にわたり追跡した。分析の結果により、すべての動物は、リボソーム封入イोजキサノール3g/kgの注射に対して生存したことが示された。これらの動物は、注射されなかった動物に比べて、観察期間にわたり体重増加の鈍化を示さなかった。リボソーム封入イोजキサノール4g及び5g/kgの投与量において、体重増加のわずかな投与量依存的減少が存在し、そして死が観察された。LD₅₀はリボソーム封入イोजキサノール5g/kgと推定された。

【0081】実施例7. ラットでの封入ヨウ素100～1000mq/kgの投与量での実施例1の乳濁液の1回の又は反復(3注射/週、3週間)静脈内注射の後、種々の組織結合酵素の血中レベルを測定し、そしてすべての主要器官の組織を種々の時点で分析した。血清酵素について、食塩水を注射した対照動物と比べてわずかな効果のみが観察された。肝臓及び脾臓中の食食細胞の投与量依存的な空胞変性の増加とは別に、リボソームによる組織学的変化は検出されなかった。食食細胞の空胞変性の程度は、肝臓及び脾臓に分布するイोजキサノールの減

少と平行して低下した。

イオジキサノール (全量)
封入されたヨウ素
ソルビトール
トロメタモール (TRIS)
EDTANa, Ca
水素添加ホスファチジルコリン
水素添加ホスファチジルセリン
注射用水 (添加して右の量にする)

を含んで成る診断組成物。

【0083】方法

リン脂質をクロロホルム/メタノール/水 (容量比 (4:1:0.025)) に溶解し、そして溶剤を蒸発させた (ロータリーエバポレーション)。イオジキサノール及びソルビトールの等張液を作り、そして60~70℃に加熱し、そしてその後の工程の間この温度を維持した。リン脂質混合物を攪拌しながら加え、そしてリボソームを形成した。リボソームのサイズを調整するため、この調製物をホモジナイズした (Rotor/Stat or ホモジナイザー)。次に、リボソームを、直列に配置された7枚のポリカーボネートフィルター (孔直径1μm) を通して押出した。生成物を、イオジキサノール及びソルビトールの等張溶液で希釈し、そしてトロメタモール及びEDTAを添加した。生成物を濾過してガラスバイアルに入れ、そして121℃にて15分間オートクレーブ滅菌した。

【0084】実施例9. イオトロラン含有リボソーム
イオジキサノールの代りにイオトロラン (iotrolan) を用い、実施例8に記載したのと同様にしてリボソームを調製した。

実施例10. 水素添加ホスファチジルグリセロールによるイオジキサノール含有リボソーム

水素添加ホスファチジルセリンの代りに水素添加ホスファチジルグリセロールを使用し、実施例8に記載したのと同様にしてリボソームを調製した。

【0085】実施例11. MRI造影剤 (ガドリニウム)

水素添加ホスファチジルコリン及び水素添加ホスファチジルセリンの脂質フィルムを、実施例1に記載したようにして調製する。10mlのGd HPDO3Aの0.5M溶液を65℃に加熱する。この混合物を65℃で加熱しながらミキサーにより15分間攪拌する。この混合物を、孔サイズ1.0μmのポリカーボネート膜フィルターを通して加圧下に濾過して多重層リボソーム (MLV) を調製する。MLVをガラスバイアルに入れ、そして121℃にて20分間オートクレーブ滅菌する。MLVはGd HPDO3Aを含有している。

【0086】実施例12. MRI造影剤 (マンガン)

Gd HPDO3Aの代わりに3, 6-ビス (N-(2, 3-ジヒドロキシプロピル) -N-メチルカルバ

* * 【0082】実施例8. 次の成分:

400mg/mL
80mg/mL
20mg/mL
0.097mg/mL
0.1mg/mL
51.2mg/mL
5.1mg/mL
1mL (約0.9mL)

10 モイルメチル]-3, 6-ジアザスベリン酸のマンガンキレート溶液 (0.07M) (WO 93/21960 (Nycomed Imaging AS)) に従って調製を用いて実施例11に従ってリボソームを調製する。MLVはマンガンキレートを含有する。

【0087】実施例13. MRI造影剤 (ジスプロシウム)

Gd HPDO3Aの代わりにDy DTPA-BMAの溶液 (0.5M) を用いて実施例11に従ってリボソームを調製する。MLVはDy DTPA-BMAを含有する。

【0088】実施例14. MRI造影剤 (酸化鉄)

Gd HPDO3Aの代わりに磁性酸化鉄の懸濁液 (10mM 粒子サイズ10~30nm) を用いて実施例11に従ってリボソームを調製する。MLVは磁性酸化鉄を含有する。

【0089】実施例15. リボソーム性Gd HPDO3A (HEPC-HEPS)

卵黄由来の水素添加ホスファチジルコリン (HEPC) 640mgと実施例1に記載したようにしてHEPCから合成した水素添加ホスファチジルセリン (HEPS) 64mgとの前調製混合物を、250mM Gd HPDO3A (ガドリドール) を含有するグルコースの5%水溶液 (等張溶液) 10mlを収容したバイアルに加えた。この混合物を65℃にて30分間攪拌し、そしてさらに1時間、この温度に保持した。このリボソーム溶液を5回凍結-融解処理し、そして65℃にて2枚重ねの400nmポリカーボネートフィルターを通して5回押し出し、標記生成物を得た。

【0090】実施例16. リボソーム性Gd HPD30A (DPPC/DPPG)

ジバルミトイルホスファチジルコリン (DPPC) 640mgと実施例1に記載したようにして調製したジバルミトイルホスファチジルグリセロール (DPPG) との脂質ブレンドを、250mM Gd HPDO3Aを含有するグルコースの5%水溶液 (等張液) 10mlを収容したバイアルに加えた。この混合物を50℃にて30分間攪拌し、そしてさらに1時間この温度で保持した。リボソーム溶液を5回凍結-融解処理し、そして50℃にて2枚重ねの400nmポリカーボネートフィルターを通して5回押し出した。

【0091】実施例 17. リボソーム性 Gd DTPA-BMA

水溶液が Gd HP-DO3A の代りに 250mM Gd DTPA-BMA (ガドジアミド) を含有した他は、実施例 15 と同じ方法を用いた。

実施例 18. リボソーム性 Dy TTHA

溶液が Gd HP-DO3A の代りに 250mM Dy TTHA (トリエチレンテトラミン六酢酸のジスプロシウム錯体) を含有した他は、実施例 15 と同じ方法を用いた。

【0092】実施例 19. 超音波造影剤

Gd HPDO3A の代わりに食塩水を用いて実施例 8 に従ってリボソームを調製する。混合物を窒素により 1 *

* 時間加圧する (70 psi)。過剰の窒素を除去し、そして生ずる混合物を、1.0 μ m の孔サイズを有するポリカーボネート膜フィルターを通して濾過する。得られる MLV は窒素ガスを含有する。

実施例 20. 実施例 8 の分散液をラットに注射 (i. v) したところ、このラットは 75mgI (封入されたもの) /kg の 47 Δ HU 及び 100mgI (封入されたもの) /kg の 70 Δ HU において、肝臓で X 線減衰を与えた。

10 実施例 21. 実施例 8 の分散液を雄性及び雌性のラットに注射した。ラットにおける静脈投与のおよその LD50 は 2000mgI (封入されたもの) /kg 体重であった。

フロントページの続き

(51)Int.Cl.⁶

A61K 49/04

識別記号

庁内整理番号

A

F I

技術表示箇所

(72)発明者 谷内 清人

東京都江戸川区北葛西 1 丁目 16 番 13 号 第一製薬株式会社東京研究開発センター内

(72)発明者 ヨー クラベネス

ノルウェー国、エン-1166 オスロ、ミドテゼン 5 ベー

(72)発明者 アルネ ベルグ

ノルウェー国、エン-1300 サンドビカ、スタスヨンスバイエン 37 デー

(72)発明者 トロンド ベー、ヤコブセン

ノルウェー国、エン-1177 オスロ、バルリウスバイ 15 ベー

(72)発明者 ボール ロングベド

ノルウェー国、エン-1450 ネソッドタンゲン、ホブデンスバイ 11

(72)発明者 トルフィン エゲ

ノルウェー国、エン-3408 トランビー、カブリフォルバイエン 16